Möglichkeiten der serologischen Differenzierung der Babesia Equi- und Babesia Caballi-Infektion des Pferdes mit Hilfe von KBR, IFAT und ELISA

Brigitte Maria Aicher

Diss. München
1989

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41534901_0040

Aus dem Institut für Vergleichende Tropenmedizin
und Parasitologie der Tierärztlichen Fakultät
der Universität München

Vorstand: Prof. Dr. Dr. h.c. J. Boch

MÖGLICHKEITEN DER SEROLOGISCHEN DIFFERENZIERUNG DER BABESIA EQUI- UND BABESIA CABALLI-INFEKTION DES PFERDES MIT HILFE VON KBR, IFAT UND ELISA

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

von
Brigitte Maria Aicher
aus
Frankenthal

München 1984

Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät
der Universität München

Dekan: Prof. Dr. W. Leidl

Referent: Prof. Dr. Dr.h.c. J. Boch

Korreferent: Prof. Dr. W. Kraft

Tag der Promotion: 24. Februar 1984

Meinen Eltern in Dankbarkeit

Inhaltsverzeichnis

Seite

I. Einleitung 1

II. Serodiagnostik der equinen Piroplasmose mit Hilfe von KBR, IFAT und ELISA unter besonderer Berücksichtigung der Spezifität (anhand der Literatur) 2

III. Eigene Untersuchungen 8

A. Material und Methoden 8

B. Ergebnisse 14

1. Parasitämie und Klinik 15

2. Antikörpernachweis bei Erstinfektionen 18

3. Antikörpernachweis bei homologen und heterologen Superinfektionen 22

IV. Besprechung der Ergebnisse 28

V. Zusammenfassung 32

Summary

VI. Literaturverzeichnis 34

Lebenslauf

I. EINLEITUNG

Die Erreger der equinen Piroplasmose sind Babesia equi und Babesia caballi. Der direkte Erregernachweis im gefärbten Blutausstrich gelingt sicher nur während der frischen Phase der Infektion. Bei latent infizierten Pferden und bei Tieren mit sehr geringer Parasitendichte im Blut ist der direkte Babesien-Nachweis nur ausnahmsweise möglich. Der Nachweis latenter Babesieninfektionen wird zunehmend mit serologischen Methoden geführt, wobei insbesondere die KBR, der IFAT und neuerdings der ELISA eingesetzt werden.

Die große Babesienart des Pferdes B. caballi läßt sich chemotherapeutisch eliminieren, die kleine Art B. equi erweist sich weitgehend als therapieresistent. Es ist somit im Hinblick auf den internationalen Pferdehandel und die Therapie wichtig zu wissen, mit welcher Art ein Tier infiziert ist, da einmal infizierte Tiere über Jahre latente Parasitenträger oder serologisch positiv sein können.

Es war daher das Ziel meiner Arbeit, die serologische Differenzierung von B. equi und B. caballi bei mono- und mischinfizierten Tieren mit Hilfe der KBR, des IFAT und des ELISA zu erarbeiten. Gleichzeitig sollte die Brauchbarkeit dieser Verfahren für die Therapie-Kontrolle überprüft werden.

II. Serodiagnostik der equinen Piroplasmose mit Hilfe von KBR, IFAT und ELISA unter besonderer Berücksichtigung der Spezifität (anhand der Literatur)

Zur Diagnose der Pferdebabesiose, die nicht zuletzt durch moderne Verkehrsmittel und den internationalen Pferdehandel weite Verbreitung gefunden hat, worauf FRIEDHOFF (1982) hinweist, stehen der direkte Erregernachweis und serologische Methoden zur Verfügung. Trotz der großen Fortschritte auf dem Gebiet der Serodiagnostik konnte kein befriedigendes Verfahren zur artspezifischen Diagnose der Babesiose bei latent infizierten Pferden erarbeitet werden. Es gilt deshalb immer noch die Forderung von TODOROVIC (1975) nach einem schnellen, objektiven, kostengünstigen und vor allem spezifischen Testverfahren.

Das erste serologische Verfahren, mit dem der Nachweis von Antikörpern gegen Babesia caballi gelang, war die von HIRATO und Mitarb. (1945) eingesetzte Komplementbindungsreaktion (KBR). 11 bis 15 Tage nach Beginn der Parasitämie ließen sich damit Antikörper nachweisen, die in einem Fall 100 Tage persistierten. Als Antigen wurde ein babesienhaltiges Hämolysat verwendet.

STEPANOVA und PETROVSKII (1975) verwendeten in der KBR als Antigen ein durch Schütteln und wiederholtes Einfrieren gewonnenes B. equi-Hämolysat. Komplementbindende Antikörper traten erstmals 4 bis 7 Tage nach Beginn der Parasitämie, zwischen dem 8. und 14. Tag p.i., auf. Die Höchsttiter von 1:160 bis 1:640 wurden zwischen dem 18. und 21. Tag p.i. nachgewiesen und fielen während eines Jahres auf 1:20 bis 1:80 ab.

REHBEIN und HEIDRICH-JOSWIG (1982) verglichen die Brauchbarkeit eines aus Lymphozytenkulturen gewonnenen Schizonten-Antigens und eines Piroplasmen-Antigens zum Nachweis von Babesia equi-Antikörpern in der KBR und im indirekten Fluoreszenz-Antikörpertest (IFAT). Im IFAT gelang es, ansteigende Antikörpertiter mit beiden Antigenen nachzuweisen; die Titer mit Piroplasmen-Antigen persistierten jedoch länger. In der KBR wurden mit Piroplasmen-Antigen zuverlässigere Werte ermittelt.

Auf Schwierigkeiten bei der Herstellung insbesondere von B. caballi-Antigen für die KBR wiesen FRERICHS, HOLBROOK und JOHNSON (1969a) hin. Durch die

zum Teil niedrige Parasitämie bei B. caballi-Infektionen und die daraus resultierende ungenügende Antigen-Aktivität reagiert Antigen, das aus Blut mit einer Parasitämie von unter 2% gewonnen wird, nur in niedrigen Verdünnungen. Durch Splenektomie und Immunsuppression mit Corticosteroiden bei den Versuchstieren wurde bei 78% der 86 Tiere eine ausreichende Parasitämie von 3 bis 4% zur Produktion von Antigen erreicht.

FRERICHS, HOLBROOK und JOHNSON (1969b) infizierten durch i.v.-Gaben von 0,25 ml bis 1,1 ml/kg KG einer Erythrozytensuspension 15 Pferde mit B. caballi. In der KBR konnten 6 bis 8 Tage nach Erscheinen der Parasiten im Blutausstrich Antikörper nachgewiesen werden. Zwischen dem 30. und 45 Tag p.i. wurden Höchsttiter von 1:1280 erreicht. Bei Verwendung von heterologem B. equi-Antigen traten Kreuzreaktionen nur während des Parasitämiestadiums auf. Dabei wurden mit dem homologen Antigen Titer von 1:640, mit dem heterologen B. equi-Antigen von 1:20 erreicht. Aufgrund dieser Ergebnisse wurde die KBR von den Autoren als spezifisch zum Nachweis von B. caballi-Antikörpern bezeichnet.

HIRATO und Mitarb. (1945) zeigten bei mit B. caballi infizierten Tieren, ebenso wie STEPANOVA und PETROVSKII (1975) bei Pferden mit einer B. equi-Infektion auf, daß komplementbindende Antikörper erstmals 4 bis 15 Tage nach Beginn der Parasitämie nachgewiesen werden konnten. Im Gegensatz dazu stehen die Ergebnisse von HEIDRICH-JOSWIG (1983), bei deren Untersuchung während einer B. equi-Infektion komplementbindende Antikörper gleichzeitig mit dem Auftreten der Parasitämie zwischen dem 14. bis 18. Tag p.i. nachgewiesen wurden.

HOLBROOK, FRERICHS und ALLEN (1972) untersuchten in einem Zeitraum von 6 Jahren 6568 Pferde in Florida mit der KBR. Dabei reagierten 627 Tiere mit B. caballi-, 54 mit B. equi-Antigen und 281 Tiere mit beiden Antigenen. Bei B. caballi-Infektionen erreichten die Titer Höchstwerte von 1:5120 zwischen dem 11. bis 45. Tag p.i., nach 18 Monaten waren die Werte auf 1:5 gesunken und persistierten in dieser Höhe 1 bis 5 Jahre. Bei den B. equi-Infektionen erreichten die Titer dagegen nur Maximalwerte von 1:640. Die Antikörperkonzentration fiel im Gegensatz zu den B. caballi-Titern nur langsam ab; 6 Jahre p.i. konnten noch Titer von 1:10 nachgewiesen werden.

Mischinfizierte Pferde reagierten in der KBR mit beiden Antigenen positiv. Bei monoinfizierten Tieren traten Kreuzreaktionen mit dem heterologen Antigen nur in Seren auf, die zum Zeitpunkt des Tests ihren höchsten Antikörpertiter aufwiesen. Die KBR wurde aufgrund dieser Resultate als die verläßlichste serologische Methode zum Nachweis und zur Differenzierung von B. equi- und B. caballi-Infektionen bezeichnet.

Dagegen wies BARNETT (1974) auf die Möglichkeit einer falsch positiven Reaktion in der KBR hin, wie sie in 1 bis 2% der Fälle auch bei nicht infizierten Rindern vorkommt (MAHONEY, 1972). BARNETT (1974) schlug vor, zur Diagnose der Babesiose große Mengen Blut von verdächtigen Pferden auf splenektomierte Tiere zu übertragen oder zusätzlich andere serologische Methoden (IFAT, Gelpräzipitation) beizuziehen; diese Tests verliefen jedoch schon 1 Jahr nach der Infektion negativ, obwohl die Tiere noch Parasitenträger waren.

DONELLY, JOYNER und FRANK (1980) untersuchten in Kuwait mit Hilfe von KBR und IFAT 35 Rennpferde im Alter von 3 bis 7 Jahren auf B. equi- und B. caballi-Antikörper. Im IFAT wurden bei 77% der Tiere B. equi- und bei 11% B. caballi-Antikörper nachgewiesen. In der KBR konnten dagegen nur bei 51% B. equi-Antikörper festgestellt werden, der Prozentsatz der Babesia caballi-positiven Tiere stimmte mit dem IFAT überein. Mit beiden Tests konnten Antikörpertiter 12 Monate lang verfolgt werden; nach 24 Monaten trat in der KBR keine Reaktion mehr auf.

Unterschiedliche Testergebnisse mit KBR und IFAT erzielten DONELLY und Mitarb. (1980) an Pferden des Sultans von Oman. Bei zwei im Abstand von 2 Jahren genommenen Probenserien wurden in 94,6% bzw. 97,7% der im Land gezüchteten Pferde Antikörper gegen B. equi im IFAT, in der KBR nur 76,8% bzw. 75% festgestellt. B. caballi-Antikörper konnten im IFAT bei 67,9% bzw. 40,9%, in der KBR lediglich bei 30,4% bzw. 40,9% der Tiere nachgewiesen werden. Bei importierten Pferden stimmten die Ergebnisse beider Testverfahren besser überein. Im IFAT konnten bei 60,4% der Tiere B. equi- und bei 6,3% B. caballi-Antikörper nachgewiesen werden; in der KBR lagen die entsprechenden Werte bei 62,5% bzw. 8,3%. Die unterschiedlichen Ergebnisse in den beiden Tests wurden auf die größere Sensibilität des IFAT und die schneller abfallenden Antikörpertiter in der KBR zurückgeführt. Während in der KBR Kreuzreaktionen

mit dem heterologen Antigen auftraten, reagierte der IFAT nur mit dem homologen Antigen.

Bei der Ausführung des IFAT lagen die Schwierigkeiten in der Herstellung eines brauchbaren Antigens, da nicht immer eine genügend hohe Parasitämie vorhanden ist, um eine ausreichende Parasitenkonzentration im mikroskopischen Bild zu gewährleisten (MADDEN und HOLBROOK, 1968). Es konnten Antikörper gegen B. caballi nachgewiesen werden. Mit dem heterologen B. equi-Antigen traten keine Kreuzreaktionen auf; der Test erwies sich als spezifisch.

LÜHR und ROSS (1968) beschrieben, daß bei der Auswertung des IFAT eine starke Hintergrundfluoreszenz die Diagnose bisweilen unmöglich macht. Sie stellten eine direkte Beziehung zwischen der zunehmenden Anämie des Antigen-Spendertieres und der Hintergrundfluoreszenz fest und erklärten dies mit dem Austreten von löslichem Antigen bei der Zerstörung von Erythrozyten. Die störende Hintergrundfluoreszenz konnte durch dreimaliges Auswaschen der Erythrozyten in gepufferter Kochsalzlösung eliminiert werden.

Über den Nachweis von B. equi-Antikörpern mit dem IFAT berichten CALLOW und Mitarb. (1979). Von 14 untersuchten Pferden waren 9 infiziert; sie erreichten Titer von 1:270 bis 1:7290. Die parasitenfreien Tiere wiesen Titer von 1:10 bis 1:90 auf. Kreuzreaktionen von B. bovis-Seren mit B. equi-Antigen bestanden nicht, während bei der Verwendung von B. bovis-Antigen und B. equi-Seren niedrige Titer von 1:30 bis 1:270 auftraten. Diese B. equi-Seren reagierten bei Verwendung von B. equi-Antigen mit Titern von 1:810 bis 1:7290.

Der von ENGVALL und PERLMANN (1972) beschriebene Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA) erwies sich als empfindliche und einfach durchzuführende Methode, um Antikörper quantitativ nachzuweisen. RUITENBERG und VAN KNAPEN (1977) setzten diesen Test zum Nachweis von Trichinella spiralis-, Toxocara canis-, Trypanosoma- und Toxoplasma gondii-Infektionen ein. Auch bei Helminthosen wurde eine größere Sensibilität des ELISA im Vergleich zum IFAT festgestellt; bei Protozoen-Infektionen waren die Ergebnisse gleichwertig.

BIDWELL und Mitarb. (1978) verglichen ELISA, IFAT und KBR zum Nachweis von Antikörpern bei experimentell mit B. divergens und B. major infizierten Rindern. Antikörper konnten mit allen Tests erstmals in den ersten 21 Tagen p.i. nachgewiesen werden. Da komplementbindende Antikörper dabei als erstes festgestellt wurden, kamen die Autoren zu dem Schluß, daß mit der KBR vor allem Neuinfektionen, mit IFAT und ELISA auch latente Infektionen nachgewiesen werden können. Sie begründeten dies damit, daß in der KBR von 3 mit B. divergens infizierten Rindern 2 bereits nach 216 Tagen negativ waren, während im ELISA und IFAT alle 3 Tiere noch Titer aufwiesen. Bei Infektionen mit Babesia major waren in der KBR 2 von 3 infizierten Tieren am 118. bzw. 180. Tag p.i. negativ, während IFAT und ELISA noch Titer aufzeigten; sie werden gegenüber der KBR als empfindlichere Testmethoden dargestellt. Die objektive Auswertung mit dem Fotometer, eine leichtere Durchführbarkeit und die Einsatzmöglichkeit unter Feldbedingungen wurden als Vorteile des ELISA gegenüber dem IFAT genannt.

Auf Schwierigkeiten bei der Auswertung des ELISA, bedingt durch Verschleppung des Enzymkonjugats, durch unspezifische Adsorption und durch verunreinigtes Konjugat, machten GELLER, HEINERT und KOHNE (1981) aufmerksam. Allerdings wiesen sie darauf hin, daß eine Verschleppung des Enzymkonjugates durch mehrmaliges Waschen der Platten, die unspezifische Adsorption durch Inkubation in einer feuchten Kammer sowie die Verunreinigung des Konjugates mit Glutaraldehyd durch 5- bis 6maliges Dialysieren des Konjugates vermieden werden kann.

GÖTZ (1982) erarbeitete Titerverlaufskurven einer B. equi-Infektion unter Verwendung des IFAT, ELISA, des indirekten Hämagglutinationstestes (IHA) und der KBR. Im ELISA ließen sich unter Verwendung von B. equi- und B. rodhaini-Antigen Antikörper nachweisen. Bei Verwendung von B. caballi-Seren und B. equi-Antigen traten zwar im ELISA, jedoch nicht in der KBR Kreuzreaktionen auf.

Schließlich erstellte MERKLE (1983) an 7 experimentell mit B. caballi infizierten Ponies mit Hilfe von ELISA, IFAT und KBR Antikörpertiter-Verlaufskurven. Er verwendete homologes B. caballi- und heterologes B. equi- sowie heterologes B. rodhaini-Antigen. In der KBR traten bei mit Vollblut infizierten Tieren 7 bis 11 Tage p.i., bei mit Stabilat infizierten Ponies

Antikörper erst zwischen dem 20. und 27. Tag p.i. auf. Maximaltiter wurden schon nach 2 bis 3 Tagen erzielt; sie lagen zwischen 1:80 und 1:320 und persistierten 3 bis 8 Tage lang.

Beim IFAT waren die ersten Titer 7 bis 17 Tage p.i. nachweisbar; sie erreichten Höchstwerte von 1:2560 bis 1:5120 zwischen dem 20. und 68. Tag p.i.

Die ersten positiven Reaktionen im ELISA traten zwischen dem 2. und 23. Tag auf. Die Maximaltiter von 1:40 bis 1:160 wurden zwischen dem 19. und 30. Tag p.i. erreicht. Im ELISA wurden Kreuzreaktionen mit beiden heterologen Antigenen nachgewiesen; die Titer hatten Höhen von 1:40 bis 1:160.

In der KBR traten Kreuzreaktionen mit Titern von 1:5 bis 1:20 nur mit dem heterologen B. equi-Antigen auf. Im IFAT reagierten die Seren mit B. rodhaini nicht; dagegen wurden mit B. equi-Antigen Titer von 1:40 abgelesen; auch nicht infizierte Tiere wiesen diese Titerstufe auf.

Neue Aspekte der Babesienforschung und -serologie ergaben sich aus den Untersuchungen von SCHEIN und Mitarb. (1981). Ihnen gelang es, die gesamte vertebrate Entwicklung von B. equi in vitro und in vivo darzustellen; dabei konnten Schizonten in den Lymphozyten nachgewiesen werden.

Diese Ergebnisse wurden von MOLTMANN und Mitarb. (1983) in einer Nachfolgeuntersuchung untermauert. Sie konnten elektronenmikroskopisch B. equi-Schizonten in Lymphozyten zeigen. Das Auftreten exoerythrozytärer Entwicklungsstadien stellt die Zuordnung von B. equi zu den Babesien in Frage.

III. Eigene Untersuchungen

A. Material und Methoden

Als Versuchstiere für die Infektion mit Babesia equi und B. caballi standen mir 11 Shetlandponies mit unterschiedlichem Alter zur Verfügung. Ein Teil der Tiere wurde in einem Offenstall mit Auslauf, der andere in einem geschlossenen Laufstall gehalten. Sie wurden mit Heu und Haferflocken gefüttert und erhielten Wasser ad libitum.

Mit Babesia equi-haltigem Blut (Parasitämie 40%) infizierte ich 5 Ponies, mit B. caballi-Blut (Parasitämie 1%o)das splenektomierte Pony 4. Nach dem Angehen der Infektion wurden 5 weiteren Ponies erregerhaltiges Blut oder gewaschene Erythrozyten inkubiert. Das Vollblut wurde in Blutkonservenflaschen mit ACD-Stabilisator gesammelt und sofort auf das Empfängertier übertragen. Zur Waschung der Erythrozyten verwendete ich sterilen PBS-Puffer pH 7,2 (Na_2HPO_4 x $2H_2O$ 17,80 g, KH_2PO_4 1,36 g, NaCl 87,70 g, Aqua dest. ad 10,0 l).

Vor und während der akuten Krankheitsphase ermittelte ich als klinische Parameter täglich Temperatur- und Hämatokritwerte. Ebenfalls täglich fertigte ich aus Kapillarblut, das aus den Ohrspitzen entnommen wurde, Blutausstriche zum Nachweis der Parasiten an und färbte diese nach GIEMSA. Nach dem Ende der Parasitämie führte ich diese Untersuchungen nur noch zweimal, nach 2 Monaten nur noch einmal wöchentlich durch.

Für die serologischen Untersuchungen entnahm ich vor der Infektion sowie im frischen Stadium zweimal, nach 2 Monaten einmal wöchentlich aus der Vena jugularis Blut. Das Serum wurde nach 2 Stunden durch Zentrifugation über 10 Minuten bei 1500 g gewonnen, anschließend in Mikro-Tubes in Mengen von 50 µl portioniert und bei -20°C aufbewahrt.

Zur Gewinnung von Babesia caballi-Antigen verwendete ich erregerhaltiges Ponyblut mit einer Parasitämie von 7%o, von B. equi-Antigen Blut mit einer Parasitämie von 60%. Das für die Antigen-Herstellung bestimmte Blut wurde in Blutkonservenflaschen mit ACD-Stabilisator gesammelt und zunächst 10 Minuten bei 1500 g zentrifugiert; anschließend saugte ich die Plasma-

und Leukozytenschichten ab. Die Erythrozyten wurden mehrmals mit PBS gewaschen, bis der Oberstand klar war. Durch Zugabe der 9fachen Menge Aqua dest. zur einfachen Menge Erythrozyten kam es zur Hämolyse. Nach 1 Minute wurden zur Wiederherstellung der Isotonie die gleiche Menge doppelt physiologischer PBS (NaCl 160,0 g, KCl 4,0 g, Na_2HPO_4 x $2H_2O$ 23,0 g, KH_2PO_4 4,0 g, $MgCl_2$ x $6H_2O$ 2,0 g $CaCl_2$ 2,0 g, Aqua dest ad 10,0 l) zugesetzt und das Hämolysat dann bei 27 500 g (in einer Sorvall RC 28 mit GSA Rotor) zentrifugiert. Nach Entfernen des Oberstandes resuspendierte ich das Sediment in einer kleinen Menge PBS, fror es anschließend mehrmals ein und taute es wieder auf. Das gelöste Sediment wurde danach in einer Durchflußzelle mit Ultraschall behandelt, zur Keimhemmung mit einigen Tropfen 0,02%igem Natriumacid versetzt und über Nacht im Kühlschrank bei 4^oC extrahiert. Zur Abtrennung der unlöslichen Bestandteile vom somatischen Antigen zentrifugierte ich bei 48 000 g in der Sorvall RC 28-Zentrifuge (mit SS 34 Rotor) nochmals, saugte das Extraktantigen ab und verwarf das Sediment. Ohne säulenchromatografische Auftrennung portionierte ich das Antigen in Glasampullen und lyophilisierte es. Das derart verarbeitete Antigen wurde schließlich bei -20^oC aufbewahrt und vor Gebrauch in sterilem Aqua dest. gelöst. Nicht verbrauchtes, gelöstes Antigen lagerte ich über mehrere Wochen, in Mikro-Tubes portioniert, bei -20^oC. Zur Proteinbestimmung verwendete ich die von LOWRY und Mitarb. (1951) modifizierte Methode nach FOLINCIOCALTEAU.

Zur Durchführung der serologischen Untersuchungen fanden in der Komplementbindungsreaktion (KBR) und im Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA) das heterologe und homologe Extrakt-Antigen, im indirekten Fluoreszenz-Antikörpertest (IFAT) Babesia equi- und B. caballi-haltige Pferde-Erythrozyten als Antigen Verwendung.

Die KBR ist eine zweiphasige Reaktion, bei der im ersten Schritt durch die Bildung eines Antigen-Antikörper-Komplexes Komplement verbraucht wird. Dadurch wird im zweiten Reaktionsschritt die Hämolyse von Hammel-Erythrozyten durch gegen sie gerichtete Antikörper (Ambozeptor) verhindert.

Zur Durchführung der KBR verwendete ich Mikrotiterplatten der Fa. Greiner und richtete mich nach den Angaben von HOLBROOK und Mitarb. (1971). Die

optimale Antigen-Konzentration und die Gebrauchsverdünnungen von Komplement und Ambozeptor ermittelte ich in Vorversuchen durch Schachbrett-Titration. Zur Verdünnung wurde ein Veronalpuffer 1:5 verwendet (NaCl 85,0 g Diäthyl-Barbitursäure 5,75 g, Diäthyl-Barbitursäure-Natrium 3,75 g, $MgCl_2 \times 6H_2O$ 1,68 g, $CaCl_2$ 0,28 g, Aqua dest ad 2,0); die Stammlösung wird zum Gebrauch 1:5 mit Aqua dest. verdünnt. In alle Reihen der Mikrotiterplatten, außer Reihe G, füllte ich 25 µl Veronalpuffer. Sodann wurden in Reihe H 25 µl, in Reihe G 50 µl 1:5 verdünntes, inaktiviertes Serum pipettiert. Die Verdünnung der Seren erfolgte in Mikro-Tubes, ihre Inaktivierung über 30 Minuten im Wasserbad bei 60°C. Ab Reihe G stellte ich mit 25 µl-Dilutern eine Verdünnungsreihe von 1:5, 1:10, 1:20 usw. her. Die Platten wurden anschließend 30 Sekunden auf einem Mikro-Shaker geschüttelt. In die Reihen G-A füllte ich pro Vertiefung 25 µl Antigenlösung ein. B. caballi-Antigen wurde mit Veronalpuffer 1:2, B. equi-Antigen 1:8 verdünnt. Nach erneutem Schütteln über 30 Sekunden pipettierte ich in jede Vertiefung der Reihen G-A 50 µl Meerschweinchen-Komplement (Fa. Behring). Bei der B. caballi-KBR verdünnte ich das Komplement 1:65, bei den Versuchen mit B. equi 1:60. Nach nochmaligem Schütteln wurden die Platten über Nacht im Kühlschrank bei 4°C gelagert. Auf jeder Testplatte führte ich zur Kontrolle ein positives und ein negatives Testserum mit.

Zur Herstellung des hämolytischen Systems verwendete ich eine 2%ige Erythrozytensuspension aus Hammel-Erythrozyten (Fa. Behring). Diese wurde zu gleichen Teilen mit dem 1:1500 verdünnten Ambozeptor 6000 der Fa. Behring gemischt und über Nacht bei 4°C gelagert. Am folgenden Tag wurde das hämolytische System bei 37°C über 30 Minuten im Wasserbad sensibilisiert. Während dieser Zeit ließ ich die Mikrotiterplatten bei Zimmertemperatur stehen. Dann wurden in jede Plattenvertiefung 50 µl hämolytisches System einpipettiert und die Platten für 1 Stunde bei 37°C im Wasserbad inkubiert. Die Auswertung der Platten erfolgte nach Sedimentation der Erythrozyten, wenn die Kontrollreihe H negativ war. Dabei legte ich folgende Wertung zugrunde: keine Hämolyse ++++, 25% Hämolyse +++, 50% Hämolyse ++, 75% Hämolyse +. Eine Reaktion von + bei einer Serumverdünnung von 1:5 wertete ich sowohl bei der B. caballi- als auch bei der B. equi-KBR als positiv.

Beim IFAT werden Serum-Antikörper an das Antigen gebunden und durch ihre Reaktion mit Fluorescein-konjugierten Antiglobulinen nachgewiesen. Als Antigen fanden B. caballi-haltiges Vollblut mit einer Parasitämie von 1,4% und B. equi-haltiges Ponyblut mit einer Parasitämie von 60% Verwendung. Das Blut wurde in der ansteigenden Phase der Parasitämie entnommen und in Blutkonservenflaschen mit ACD-Stabilisator gesammelt. Nach 2stündiger Lagerung bei Raumtemperatur wurde bei 1500 g zentrifugiert und anschließend mit einer Wasserstrahlpumpe Plasma und Leukozytenschicht abgesaugt. Die verbleibenden Erythrozyten wurden in PBS so lange gewaschen, bis der Oberstand vollkommen klar war. Den Oberstand entfernte ich dann und resuspendierte die Erythrozyten mit PBS auf das Ausgangsvolumen. Noch am Tag der Gewinnung brachte ich mit einer Pasteurpipette das nochmals mit PBS verdünnte Antigen auf gefelderte Objektträger (Fa. Fresenius), ließ die beschichteten Objektträger über Nacht lufttrocknen, packte sie am nächsten Tag einzeln in Seidenpapier ein und schweißte sie unter Beigabe von Kieselgel als Feuchtigkeitsindikator in Plastiktüten ein. Die Lagerung erfolgte bei -20°C in Kunststoffschachteln. Vor Gebrauch wurden die Objektträger ausgepackt und über 1 Stunde bei Raumtemperatur belassen und anschließend beschriftet. Das Serum verdünnte ich in u-förmigen Mikrotiterplatten der Fa. Greiner. In die Reihe H der Platte wurde 0,15 ml IFAT-Puffer (1:20 verdünntes Phosphat-Puffer-Konzentrat der Fa. Behring), in die Reihen A-G 0,05 ml Puffer mittels einer Multi-Pipette eingefüllt. Anschließend wurden in Reihe H 0,01 ml Testserum pipettiert und mit einem 50 µl fassenden Diluter die Serumverdünnungen 1:16, 1:32, 1:64 usw. hergestellt. Diese Verdünnungen brachte ich mit einer 10 µl fassenden Pipette in absteigender Konzentration auf die entsprechenden Reaktionsfelder der Objektträger auf. Bei den Tests wurde stets ein positives und ein negatives Kontrollserum mitgeführt.

Die derart beschichteten Objektträger inkubierte ich anschließend in einer feuchten Kammer bei 37°C 45 Minuten lang, wusch danach das Serum unter einem Wasserstrahl ab und reinigte die Objektträger 3 x 5 Minuten in PBS von überschüssigem Serum. Anschließend trocknete ich die Objektträger mit Löschpapier. Dann pipettierte ich auf jedes Reaktionsfeld 0,01 ml 1:20 verdünntes Konjugat. Hierfür verwendete ich Fluorescein-conjugated IgG Fraction Goat Anti-Horse IgG (Heavy and Light Chains) der Fa. Cappel Lab., das mit

IFAT-Puffer verdünnt wurde. In der Konjugatverdünnung waren zusätzlich 0,1% Evans blue enthalten. Nach dem Auftragen des Konjugates wurde nochmals 45 Minuten in der feuchten Kammer bei 37°C inkubiert. Nach Abspülen des Konjugates unter einem Wasserstrahl wusch ich die Objektträger 3 x 5 Minuten in PBS und dann nochmals 5 Minuten in Aqua dest., gab nach dem Trocknen mit Löschpapier gepuffertes Glyzerin pH 7,6 zu und legte ein Deckglas auf. Die Auswertung erfolgte im Fluoreszenzmikroskop (Orthoplan, Fa. Leitz, Auflichtfluoreszenz) bei 252facher Vergrößerung. Als positiv wertete ich, wenn die in den Erythrozyten gelegenen Parasiten bei B. equi-beschichteten Objektträgern in einer Serumverdünnung von 1:32 und höher, bei B. caballi-beschichteten Objektträgern in einer Serumverdünnung von 1:64 und höher fluoreszierten.

Beim Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA) wird das Antigen an die Immunolon^{R} (Polystyrol)-beschichteten Oberflächen der Mikrotiterplatten gebunden. Im Serum vorhandene Antikörper bilden mit dem gebundenen Antigen einen Antigen-Antikörper-Komplex. Peroxydase konjugierte Antikörper reagieren mit den an das Antigen gebundenen Antikörpern. Die Konzentration der Serumantikörper entspricht der Verfärbung des durch Peroxydase gespaltenen Substrats.

Die optimale Antigen-Konzentration für die Beschichtung der Mikrotiterplatten (Fa. Contron) ermittelte ich durch Antigentitration. Die Antigenverdünnung wurde mit Coating-Puffer (Na_2CO_3 1,59 g, $NaHCO_3$ 2,93 g, Aqua dest. ad 1000 ml) hergestellt. Bei B. caballi-Antigen verwendete ich zur Durchführung des Tests eine Proteinkonzentration von 0,02 mg/ml, desgleichen bei B. equi-Antigen. In jede Vertiefung der Mikrotiterplatten wurden 0,10 ml Antigenlösung eingefüllt und diese danach 30 Sekunden auf einem Mikro-Shaker (Fa. Dynatech) geschüttelt. Nach 3stündigem Inkubieren in einer feuchten Kammer bei 37°C wurden die Platten über Nacht im Kühlschrank bei 4°C gelagert. Am darauffolgenden Tag spülte ich die Platten 2 x 1 Minute mit kaltem Leitungswasser, dann mit PBS-Tween (NaCl 80,0 g, KH_2PO_4 2,0 g, $Na_2HPO_4 \times 2H_2O$ 14,4 g, KCl 2,0 g, Tween 20 5 ml, Aqua dest ad 10 l) aus. Flüssigkeitsreste wurden durch Ausklopfen der Platten entfernt.

Für die Serumverdünnung legte ich in die Reihen A-G 0,05 ml, in die Reihe H 0,075 ml 0,5%iges BSA-PBS (PBS mit 0,5% bovinem Serumalbumin) vor. In die erste Vertiefung der Reihe H wurde als Konjugat-Substrat-Kontrolle 25 ml 0,5%iges BSA-PBS, in die zweite Vertiefung 0,025 ml eines negativen und in die dritte 0,025 ml eines positiven Serums als Negativ- und Positivkontrolle einpipettiert. Die zu untersuchenden Testseren füllte ich in die übrigen Vertiefungen der Reihe H in einer Menge von 0,025 ml ein. Die Verdünnungsreihe von 1:4, 1:8, 1:16 usw. wurde nun mit einem 0,05 ml fassenden Diluter hergestellt. Die Platten wurden dann 1 Stunde lang bei 37°C auf einem Taumelgerät inkubiert. Nach erneutem Ausschütten und Waschen der Platten mit PBS-Tween und Wasser füllte ich in jede Vertiefung 0,05 ml eines mit 4%igem BSA-PBS (96 ml PBS und 4 g bovines Serumalbumin) verdünnten Konjugates ein; hierfür verwendete ich Peroxidase conjugated IgG Fraction Goat, Anti-Horse IgG (Heavy and Light Chains). Die Konjugatverdünnung betrug bei B. caballi-und bei B. equi-Elisa 1:1500.

Nach Einfüllen des Konjugates wurden die Platten erneut geschüttelt und nochmals 1 Stunde bei 37°C inkubiert. Nach erneutem Auswaschen wurde als Substrat 0,08%ige 5-Amino-2-hydroxibenzoesäure ($C_7H_7NO_3$), die mit 1N NaOH kurz vor Gebrauch auf pH 6,0 eingestellt und mit 0,05%iger H_2O_2-Lösung im Verhältnis 10:1 gemischt wurde, zugegeben. Die eingefüllte Substratmenge betrug 0,10 ml. Die Platten wurden nun nochmals geschüttelt und 1 Stunde bei Zimmertemperatur im Dunkeln inkubiert. Die Auswertung der Ergebnisse erfolgte in einem Titertek^R-Multiskan bei 450 nm mit automatischem Ausdruck der Ergebnisse. Titer ab 1:64 wertete ich sowohl bei B. caballi- als auch bei B. equi-Seren als positiv, da sie in dieser Serumverdünnung den negativen Standard übertrafen.

B. Ergebnisse

Der Ausgangsstatus der Versuchstiere sowie die von mir gesetzten experimentellen Infektionen bei den einzelnen Ponies sind in Tabelle 1 als Übersicht den Ergebnissen vorangestellt.

Pony Nr.	Alter (Jahre)	Infektionsstatus bei B. equi-/B. caballi-Infektionen
1	3	seit 2 Jahren mit B. equi infiziert, z.Z. der Superinfektion noch Parasitenträger; mit 50 ml B. equi-haltigem Blut infiziert
2	2	seit 1 Jahr mit B. caballi infiziert, z.Z. der Superinfektion noch Parasitenträger; mit 5 ml B. equi-haltigem Blut infiziert
3	1	mit 5 ml B. equi-haltigem Blut infiziert, Superinfektion mit 300 ml B. caballi-haltigen gewaschenen Erythrozyten von Pony 4
4	1	Splenektomie; mit 600 ml B. caballi-haltigem Blut infiziert
5	10	mit 500 ml B. caballi-haltigem Blut von Pony 4 infiziert
6	3	vor 15 Monaten mit B. caballi infiziert, Therapie mit Berenil^{R}; mischinfiziert mit 500 ml Blut von Pony 3
7	1/2	mischinfiziert mit 100 ml Blut von Pony 3
8	1/2	mischinfiziert mit 100 ml Blut von Pony 3
9	9	mit 500 ml B. caballi-haltigem Blut von Pony 5 infiziert
10	2	Splenektomie; Erstinfektion mit B. caballi, Behandlung mit Berenil^{R}; Superinfektion mit 5 ml B. equi-haltigem Blut
11	2	Splenektomie; Erstinfektion mit B. caballi, Behandlung mit Berenil^{R}; Superinfektion mit 5 ml B. equi-haltigem Blut

Tab. 1: Darstellung des Ausgangsstatus der Versuchstiere sowie der Infektionen mit Babesia equi und/oder B. caballi

1. Parasitämie und Klinik

Nach der Infektion der Ponies trat bei Pony 3 nach 3 Tagen eine Parasitämie auf, die 10 Tage anhielt und eine Höhe von 1,2% erreichte. Bei Pony 4, 5 und 9 konnten die ersten Parasiten 2 bis 4 Tage p.i. nachgewiesen werden. Die Dauer des Nachweises schwankte zwischen 4 und 9 Tagen; die Parasitämie erreichte eine Höhe von 3 bis 7‰.

Die Infektion von Pony 7 und 8 erfolgte mit Blut von Pony 3, das latent mit B. equi und frisch mit B. caballi infiziert waren. Die Parasitämie setzte 1 und 2 Tage p.i. ein und erreichte eine Höhe von 1 und 2‰; im Blutausstrich gelang nur der Nachweis von B. caballi. Pony 6 zeigte keine Parasitämie nach der Inokulation von Blut von Pony 3.

Bei dem vor zwei Jahren mit B. equi infizierten Pony 1 konnten bei Versuchsbeginn im Blutausstrich vereinzelt Parasiten nachgewiesen werden. Nach der Superinfektion stieg die Parasitämie am ersten Tag auf 2‰ an und persistierte für 4 Tage. Auch bei Pony 2 konnte vor der Superinfektion B. caballi noch nachgewiesen werden. Nach der heterologen Superinfektion mit B. equi erreichte die Parasitämie am ersten Tag 2‰ und blieb in dieser Höhe 109 Tage bestehen; während dieser Zeit ließen sich B. equi und B. caballi gleichzeitig im Blutausstrich nachweisen.

Pony 3 wurde 165 Tage nach der B. equi-Erstinfektion mit B. caballi infiziert. Auch hier war bereits am ersten Tag nach der neuen Infektion eine Parasitämie aufgetreten. Sie erreichte eine Höhe von 4‰ und persistierte 7 Tage.

Nach der heterologen Superinfektion von Pony 10 und 11 trat die Parasitämie nach 2 und 3 Tagen auf; sie blieb 7 und 4 Tage bestehen und erreichte eine Höhe von 25,4 und 38,6%. Das Angehen der Superinfektionen wurde somit in allen Fällen durch das Auftreten einer Parasitämie belegt. Abweichungen hinsichtlich des Parasitämieverlaufs und der -höhe im Vergleich zu Erstinfektionen konnten nicht festgestellt werden.

Die Klinik war durch Fieber, das gleichzeitig oder vor dem Erscheinen der Parasiten im Blut auftrat, gekennzeichnet. Die Körpertemperaturen bei den erstinfizierten Tieren schwankten zwischen 38,0 und 41,3°C, bei den super- und mischinfizierten Ponies zwischen 38,0 und 41,7°C. Bei der B. equi-Infektion wurden Temperaturen von 39,2°C, bei den B. caballi-Infektionen von 39,7 bis 41,3°C gemessen (Tab. 2).

Infektion	Pony Nr.	Körpertemperaturen °C ... Tage p.i. 1.	2.	5.	7.	9.	11.	13.	15.	17.	19.	25.
B. equi	3	38,0	39,2	38,0	37,5	38,0	37,8	37,2	37,8	37,0	37,7	37,5
Monoinf.	4	37,5	37,5	38,5	38,9	41,3	39,0	40,0	38,0	39,0	38,0	37,5
B. caballi	5	37,9	38,3	39,7	39,3	39,0	39,0	38,8	37,8	37,5	37,8	37,6
	6	37,6	38,o	37,9	37,5	37,5	37,7	37,6	37,5	37,5	37,6	37,5
Mischinf.	7	38,0	38,7	39,2	40,5	38,7	39,5	37,8	37,7	37,5	37,6	37,5
	8	37,8	40,5	39,2	38,2	37,7	37,8	37,7	37,6	37,6	37,7	37,6
	1	37,5	38,2	38,0	37,0	37,5	37,7	37,7	37,5	37,5	37,7	37,5
Superinf.	2	37,7	39,0	38,2	38,0	37,7	37,5	37,7	37,6	37,3	37,5	37,5
	3+	37,8	41,7	41,0	39,0	37,9	37,3	37,5	37,8	37,3	37,4	37,4

Tab. 2: Fieberverlauf bei experimentell mit Babesia equi und/oder B. caballi infizierten Ponies

+Werte nach der Superinfektion

Im Verlauf von Erstinfektionen fiel der Hämatokrit unabhängig von der Babesienart auf Werte von 12 bis 20%, in einem Fall (Pony 4) bis auf 10% ab. Dagegen wirkten sich, mit Ausnahme von Pony 3, weder homologe noch heterologe Superinfektionen auf den Hämatokrit aus; es blieben Werte von 35 und 36% weiterhin bestehen (Tab. 3).

Infektion	Pony Nr.	Hämatokrit ... % Tage p.i. 1.	3.	5.	7.	9.	11.	13.	15.	17.	19.	21.	23.	25.
B. equi	3	37	25	25	25	28	20	28	26	31	30	34	30	30
Monoinf.	4	34	40	28	20	25	15	10	12	14	16	20	22	26
B. caballi	5	38	30	20	28	28	25	25	25	30	25	25	28	28
	6	38	38	34	36	37	28	28	30	30	32	36	36	38
Mischinf.	7	35	25	12	12	14	20	18	18	16	18	22	30	32
	8	35	25	16	14	20	18	18	16	18	24	30	30	34
	1	36	38	40	40	36	40	35	38	40	40	40	38	40
Superinf.	2	42	42	40	40	40	36	40	40	40	40	41	38	40
	3+	34	30	20	30	22	16	20	14	14	18	18	18	20

Tab. 3: Hämatokritwerte bei experimentell mit Babesia equi und/oder B. caballi infizierten Ponies

+Werte nach der Superinfektion

(□ = niedrigste Werte im Verlauf der Infektion

Neben Fieber und Hämatokritabfall zeigten die Ponies während der frischen Phase der Infektion serösen Nasen- und Augenausfluß, ikterische Schleimhäute und Dyspnoe. Pony 9 verendete 5 Tage p.i., Pony 10 nach 9 und Pony 11 nach 7 Tagen. Sämtliche B. equi- und B. caballi-Infektionen sowie die Super- und Mischinfektionen wiesen ein einheitliches klinisches Erscheinungsbild auf.

Die Behandlung der B. caballi-Infektion von Pony 4 am 10. Tag p.i. mit 3,5 mg/kg KG Berenil^{R} führte innerhalb eines Tages zum Verschwinden der Parasiten im Blut. Pony 2 wurde am 156. Tag nach der Superinfektion mit Berenil^{R} behandelt. Bei Pony 5 erfolgte die Therapie am 35. Tag p.i., bei Ponies 7 und 8 am 30. Tag p.i. Da bei diesen Tieren zum Zeitpunkt der

Therapie keine Parasiten im Blutausstrich mehr nachweisbar waren, konnte eine direkte Erfolgskontrolle nicht durchgeführt werden.

2. Antikörpernachweis bei Erstinfektionen

In der KBR traten bei den erstinfizierten Ponies zwischen dem 2. und 10. Tag p.i. die ersten Antikörpertiter auf. Die Höchsttiter lagen zwischen 1:40 und 1:320 und wurden zwischen dem 12. und 37. Tag p.i. erreicht (Tab. 4, Seite 25).

Bei den mischinfizierten Ponies 6, 7 und 8 konnten sowohl B. equi- als auch B. caballi-Antikörper nachgewiesen werden. Die B. equi-Antikörpertiter, deren Maximum bei 1:160 bzw. 1:320 lag, persistierten bis zum Versuchsende am 63. bzw. 67. Tag p.i. auf Werten von 1:20 und 1:40. Die B. caballi-Titer erreichten Höchstwerte von 1:40 bis 1:320. Sie fielen, im Gegensatz zu den B. equi-Titern, bei Pony 6 innerhalb von 67 Tagen, bei den mit Berenil^{R} behandelten Ponies 7 (Abb. 1) und 8 33 Tage nach der Therapie (am 63. Tag p.i.) auf negative Werte ab.

Abb. 1: Antikörperverlauf bei dem mit Babesia equi und B. caballi mischinfizierten Pony 7 unter Verwendung von B. equi-(---) und B. caballi-(——) Antigen in der KBR

Bei dem monoinfizierten Pony 5 wurde die KBR am 72. Tag p.i. (= 36. Tag der Behandlung) negativ. Lediglich bei Pony 4 war am 50. Tag der Therapie noch ein Titer von 1:5 vorhanden. Der Titerverlauf bei den nicht behandelten Ponies unterscheidet sich durch einen steilen Abfall zwischen dem 60. und 67. Tag p.i. vom Titerverlauf bei therapierten Ponies. Hier fiel der Titer nach der Therapie innerhalb von 15 bis 28 Tagen auf 1:5 ab, persistierte 7 bis 15 Tage und fiel dann auf negative Werte ab (Abb. 2).

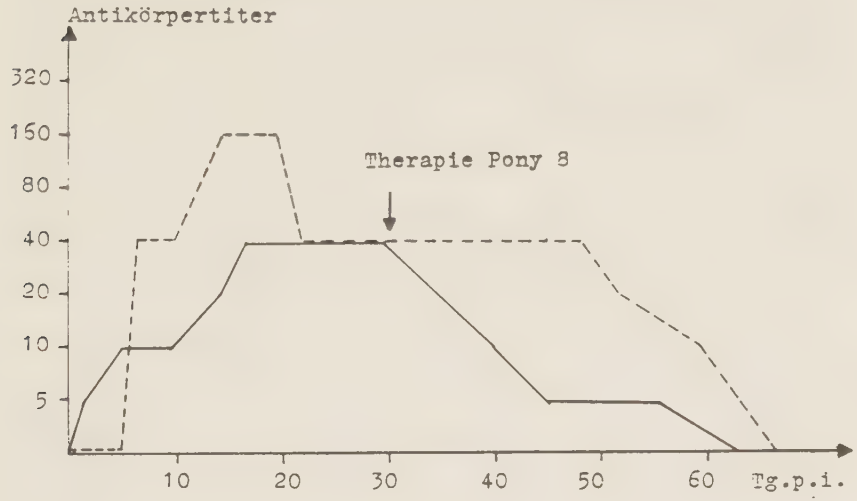

Abb. 2: Antikörperverlauf bei Pony 6 (---) und dem mit Berenil^{R} behandelten Pony 8 (——) unter Verwendung von B. caballi-Antigen in der KBR

Bei der Erstinfektion von Pony 3 mit B. equi traten am 4. Tag p.i. die ersten Antikörper auf; sie erreichten am 12. Tag p.i. einen Titer von 1: 320, der bis zum 37. Tag p.i. persistierte, dann langsam abfiel und bei Versuchsende bei 1:5 lag.

Der IFAT wurde zwischen dem 3. und 10. Tag p.i. positiv. Die Seren erreichten zwischen dem 17. und 58. Tag p.i. Höchsttiter von 1:512 bis 1:4096 (Tab. 4, Seite 25).

Bei den Ponies 6, 7 und 8 (Abb. 3) traten B. equi-Titer von 1:512 und B. caballi-Titer von 1:512 und 1:1024 auf. Bei Versuchsende am 63. bzw. 67. Tag p.i. waren B. equi-Titer von 1:256 und, unbeeinflußt von der Berenil^{R}-Therapie, B. caballi-Titer von 1:128 und 1:256 nachweisbar. Zu diesem Zeitpunkt war in der KBR bei diesen Tieren kein B. caballi-Titer mehr feststellbar.

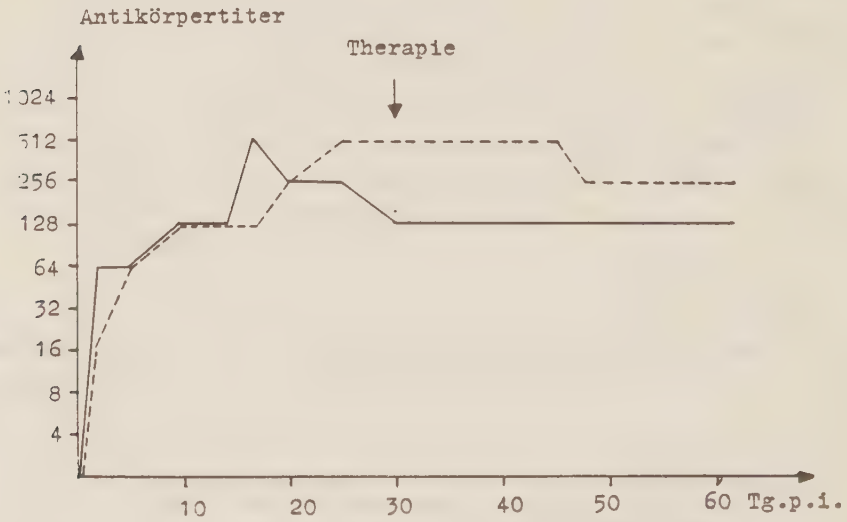

Abb. 3: Antikörperverlauf bei dem mit Babesia equi und B. caballi mischinfizierten Pony 8 unter Verwendung von B. equi-(---) und B. caballi-Antigen (——) im IFAT

Pony 5 erreichte am 21. Tag p.i. mit einem B. caballi-Titer von 1:4096 den höchsten Wert im IFAT. Der Titer fiel innerhalb von 20 Tagen auf 1:512 ab und persistierte auch nach der Therapie mit Berenil^{R} bis zum Versuchsende in dieser Höhe.

Bei Pony 4 stieg der B. caballi-Titer am 15. Tag nach der Behandlung auf 1:1024 an und fiel dann innerhalb von 20 Tagen auf 1:64 ab; auf dieser Höhe blieb er bis zum Versuchsende am 60. Tag p.i.

Pony 3 zeigte bei der Erstinfektion mit B. equi einen Titer von 1:64; dieser stieg auf 1:1024 zwischen dem 21. und 31. Tag p.i. an und war bei Versuchsende auf 1:64 abgefallen (Tab. 4).

Im ELISA traten die ersten Titer zwischen dem 2. und 19. Tag p.i. auf. Die Maximalwerte lagen bei 1:128 und 1:256 und wurden zwischen dem 5. und 28. Tag p.i. erreicht (Tab. 4). Mit Ausnahme von Pony 5 persistierten die Maximaltiter der erstinfizierten Ponies bis zum Versuchsende oder fielen nur um eine Titerstufe ab (Abb. 4).

Bei Pony 5 fielen die Titer innerhalb von 24 Tagen um 2 Stufen auf 1:64 ab. Wie auch im IFAT wurde der Titerverlauf durch die Behandlung der B. caballi-Infektionen mit Berenil^{R} nicht beeinflußt.

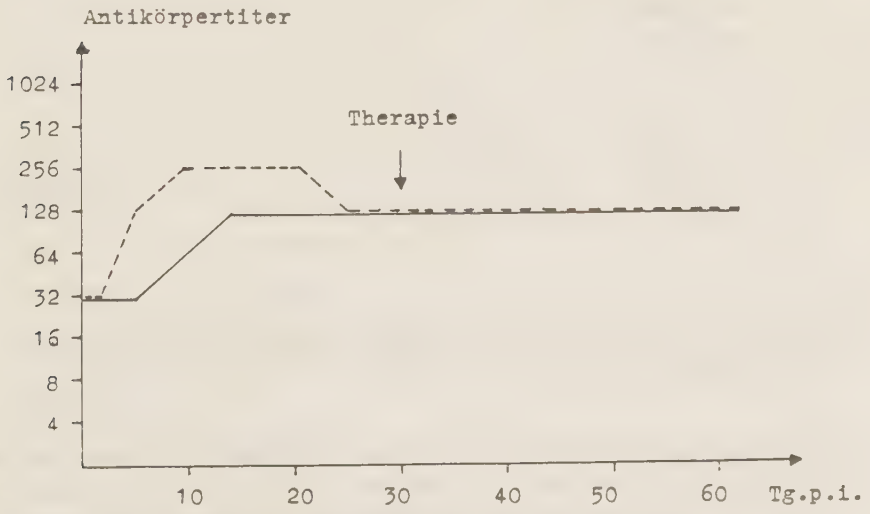

Abb. 4: Antikörperverlauf bei Pony 8 unter Verwendung von Babesia equi- (---) und B. caballi-Antigen (——) im ELISA

3. Antikörpernachweis bei homologen und heterologen Superinfektionen

Das schon seit zwei Jahren mit B. equi latent infizierte Pony 1 war in der KBR bei Versuchsbeginn gegen B. equi-Antigen negativ. Am 4. Tag nach der Superinfektion traten B. equi-Antikörper in Höhe von 1:10 auf. Der Maximaltiter von 1:20 wurde am 10. Tag nach der Superinfektion erreicht; zu Versuchsende am 232. Tag war noch ein Titer von 1:5 vorhanden (Abb. 5, Tab. 4).

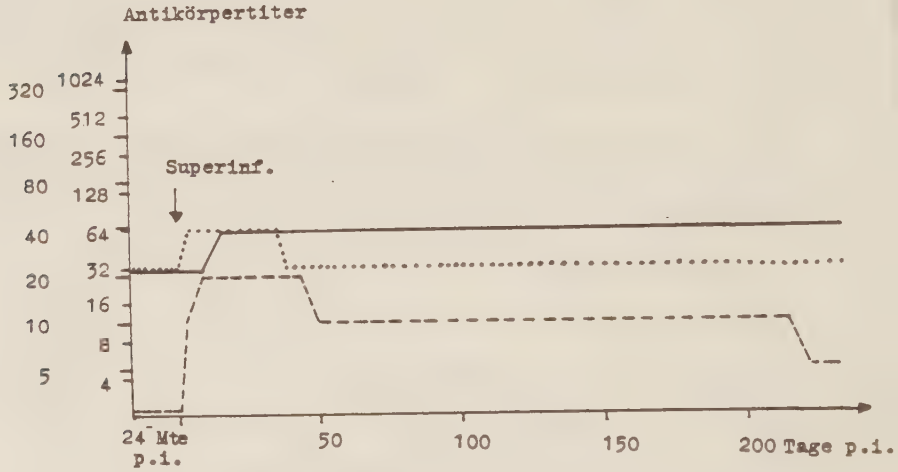

Abb. 5: Antikörperverlauf bei der homologen Superinfektion mit Babesia equi bei Pony 1 unter Verwendung von B. equi-Antigen KBR (---), IFAT (——), ELISA (...)

B. caballi-Antikörpertiter von 1:5 waren vor der heterologen Superinfektion von Pony 2 mit B. equi-Antigen nachweisbar. Nach der Behandlung mit 3,5 mg/kg KG Berenil^{R} am 156. Tag nach der Superinfektion wurde die KBR innerhalb

von 12 Tagen negativ. B. equi-Antikörper traten mit einem Titer von 1:80 erstmals am 4. Tag nach der Superinfektion auf und erreichten am 37. Tag den Maximaltiter von 1:160. Bei Versuchsende war noch ein Titer von 1:5 nachweisbar (Abb. 6, Tab. 4).

Pony 3 wies vor der heterologen Superinfektion mit B. caballi einen B. equi-Titer von 1:20 auf, der bei Versuchsende auf 1:5 abgesunken war. Am 2. Tag nach der Superinfektion war ein B. caballi-Titer von 1:10 nachweisbar; dieser erreichte zwischen dem 18. und 28. Tag sein Maximum von 1:80 und wurde nach weiteren 33 Tagen negativ (Tab. 4).

Pony 1 hatte im IFAT vor der Superinfektion noch einen B. equi-Titer von 1:32, der am 15. Tag auf 1:64 anstieg und bis zum Versuchsende am 232. Tag persistierte (Abb. 5).

Bei Pony 2 und 3 waren vor der heterologen Superinfektion noch Antikörpertiter von der Erstinfektion vorhanden. Pony 2 wies einen B. caballi-Titer von 1:128, Pony 3 einen B. equi-Titer von 1:64 auf. Am 3. Tag nach der Superinfektion konnten dann bei Pony 2 B. equi-Antikörpertiter von 1:32 (Abb. 6), bei Pony 3 am 7. Tag B. caballi-Titer von 1:256 aufgezeigt werden. Die Ponies erreichten den Maximaltiter von 1:1024 am 21. Tag (Tab. 4). Bei Versuchsende am 232. Tag war bei Pony 2 ein B. equi-Titer von 1:64 (Abb. 6) und ein B. caballi-Titer von 1:32 nachweisbar.

Bei Pony 3 war zu Versuchsende ein B. caballi-Titer von 1:256 und ein B. equi-Titer von 1:64 vorhanden (Tab. 4).

Bei Pony 1 war ein Grenztiter von 1:32 im ELISA vor der homologen Superinfektion nachweisbar; am 3. Tag danach stieg der Titer auf 1:64 an, persistierte in dieser Höhe bis zum 37. Tag nach der Superinfektion und fiel dann auf 1:32 ab (Abb. 5).

Ein B. caballi-Titer von 1:64 war bei Pony 2 vor der heterologen Superinfektion vorhanden; am 181. Tag danach fiel der Titer auf 1:32 ab. Drei Tage nach der Superinfektion konnten dann auch B. equi-Antikörpertiter von 1:32 festgestellt werden. Der Maximaltiter von 1:128 blieb vom 3. bis 102. Tag bestehen (Abb. 6), bei Versuchsende war er auf 1:32 gefallen.

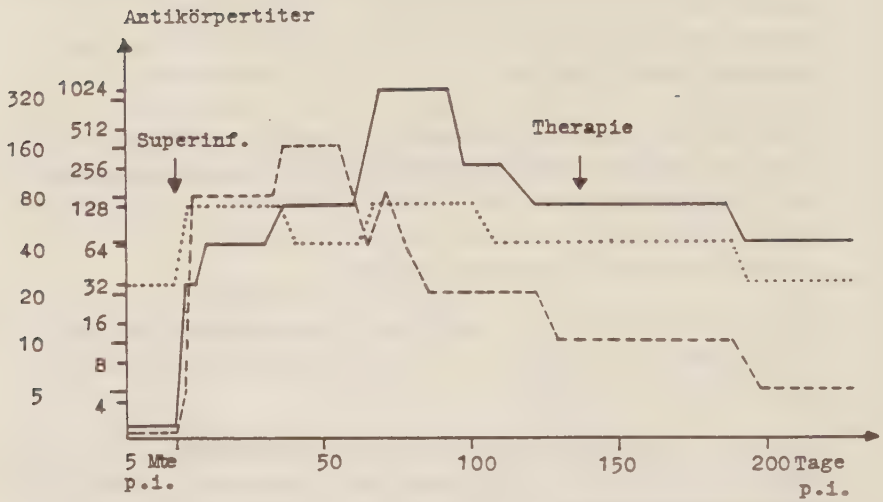

Abb. 6: Antikörperverlauf der heterologen Superinfektion mit Babesia equi bei Pony 2 unter Verwendung von B. equi-Antigen (KBR (---), IFAT (——), ELISA (...)

Ein B. equi-Titer von 1:32 konnte bei Pony 3 vor der heterologen Superinfektion nachgewiesen werden, der bis zum Versuchsende bestehen blieb. Am 4. Tag nach der Superinfektion trat zusätzlich ein B. caballi-Titer von 1:64 auf, der am 21. Tag auf 1:128 anstieg und bei Versuchsende 1:64 betrug (Tab. 4).

Infektion	Pony Nr.	KBR a	KBR b	KBR c	KBR d	IFAT a	IFAT b	IFAT c	IFAT d	ELISA a	ELISA b	ELISA c	ELISA d
B. equi	3	4	12-37	320	5	10	52-58	1024	64	10	12	256	32
B. caballi	4	6	25-28	160	5	6	25	1024	64	6	28-33	256	128
Monoinf.	5	10	16-37	320	neg.	10	21	4096	512	7	10-23	256	64
Mischinfektion B.equi	6	9	17-22	160	20	6	37	512	256	6	6-67	128	128
Mischinfektion B.cab.	6	7	14-19	160	neg.	4	18-22	1024	128	19	22-67	128	128
Mischinfektion B.equi	7	5	13	320	40	5	25-45	512	256	2	5-29	256	128
Mischinfektion B.cab.	7	5	25	160	neg.	3	17	512	256	2	2-63	64	64
Mischinfektion B.equi	8	5	13	320	20	5	30-44	512	256	5	9-20	256	128
Mischinfektion B.cab.	8	2	17-28	40	neg.	5	17-63	512	128	9	13-63	128	128
Superinf.	1	4	10-42	20	5	1	15-193	64	32	3	3-37	64	32
Superinf.	2	4	37-57	160	5	3	68-93	1024	64	3	3-102	128	32
Superinf.	3+	2	18-28	80	neg.	7	21-31	1024	256	4	21-31	128	64

Tab. 4: Charakteristika des Antikörpertiterverlaufs in der KBR, IFAT und ELISA bei experimentell mit Babesia equi und B. caballi infizierten Ponies
a = erste positive Reaktion nach der Infektion (... Tage p.i.)
b = Maximaltiter (Tage p.i.)
c = Maximaltiter - reziproke Werte (1:...)
d = Titer bei Versuchsende
+Werte nach Superinfektion

Die Untersuchungen ergaben eine unterschiedliche Spezifität der drei Nachweisverfahren. Es zeigte sich, daß in der KBR bei mit B. equi oder B. caballi monoinfizierten Tieren Kreuzreaktionen mit dem heterologen Antigen nicht auftraten (Abb. 7). Dagegen wurden bei Mischinfektionen stets Antikörper mit beiden Antigenen nachgewiesen.

Im IFAT traten Kreuzreaktionen mit dem heterologen Antigen auf. Bei Pony 4 und Pony 5 (Abb. 7) wurden mit B. equi-Antigen Titer von 1:32 festgestellt. Lediglich bei Pony 3 kam es während der B. equi-Infektion zu einer Kreuzreaktion (1:16) mit B. caballi-Antigen. Bei Pony 1 trat keine Kreuzreaktion nach der Superinfektion auf. Bei den heterolog superinfizierten und den mischinfizierten Ponies ließen sich auch im IFAT mit beiden Antigenen Antikörper nachweisen.

Im ELISA wurden die stärksten Kreuzreaktionen beobachtet. So reagierte bei den mit B. caballi monoinfizierten Ponies 4 und 5 (Abb. 7) auch das heterologe B. equi-Antigen mit einem Titer von 1:64 positiv.

Abb. 7: Antikörperverlauf bei dem experimentell mit Babesia caballi infizierten Pony 5 unter Verwendung von B. caballi- und B. equi-Antigen KBR (---), IFAT (——), ELISA (...)

Auch bei dem mit B. equi infizierten Pony 3 trat mit dem B. caballi-Antigen ein Titer von 1:32 auf.

Eine klare serologische Differenzierung ist mit der KBR durchführbar, da keine Kreuzreaktionen auftraten. Mit dem IFAT ist dies nur während der frischen Phase der Infektion möglich. Mit dem homologen Antigen werden hierbei um 5 bis 7 Stufen höhere Titer erreicht als unter Verwendung des heterologen Antigens (Abb. 7). Durch die auftretenden Kreuzreaktionen kann bei der latenten Infektion wegen der Annäherung der Titer keine sichere Differenzierung erreicht werden. Mit dem ELISA ist eine Differenzierung nicht möglich, da Kreuzreaktionen bis 1:64 auftraten.

IV. Besprechung der Ergebnisse

Ziel meiner Arbeit war es, die Brauchbarkeit der Komplement-Bindungsreaktion, des indirekten Fluoreszenz-Antikörpertestes und des Enzyme-linked immunosorbent assay zur serologischen Differenzierung von Babesia equi und B. caballi zu untersuchen. Um die Spezifität dieser Verfahren festzustellen, wurden die Seren von mono-, misch- und superinfizierten Ponies jeweils mit B. equi- und B. caballi-Antigen ausgetestet. Des weiteren sollte die Brauchbarkeit dieser Verfahren für die Therapiekontrolle überprüft werden.

Nach der Infektion mit B. equi konnten 2 bis 3 Tage die ersten Erreger im Blutausstrich nachgewiesen werden. Pony 1 hatte vor der Superinfektion noch eine Parasitämie. Bei den B. caballi-Infektionen kam es nach der Inokulation von 500 bis 600 ml Blut bei erwachsenen Tieren und 100 ml bei den Fohlen innerhalb von 1 bis 3 Tagen zur Parasitämie. Bei Pony 2 ließen sich vor der heterologen Superinfektion noch Parasiten nachweisen. Die kurze Inkubationszeit ist, wie schon HOURRIGAN und KNOWLES (1979) berichteten, auf die hohe Infektionsdosis zurückzuführen.

Die bei meinen Untersuchungen festgestellten klinischen Symptome beschrieben auch RISTIC (1977) sowie ROBERTS und Mitarb. (1962); sie stellten ebenfalls einen Abfall des Hämatokrit bis unter 20% fest.

Der direkte Erregernachweis gelang meist und vor der serologischen Reaktion. Darauf haben auch HIRATO und Mitarb. (1945) sowie STEPANOVA und PETROVSKII (1975) hingewiesen. Im allgemeinen waren Babesien im Blutausstrich nur in der frischen Phase der Infektion festzustellen; dies berichteten auch KNOWLES, HOURRIGAN und HOLBROOK (1980). In zwei Fällen konnten jedoch auch in der latenten Phase Erreger direkt nachgewiesen werden, so bei Pony 1 2 Jahre p.i. B. equi und bei Pony 2 fünf Monate p.i. B. caballi.

In der KBR traten zwischen dem 2. und 10. Tag p.i. Antikörper in Übereinstimmung mit den Ergebnissen von MERKLE (1983) auf. Die Titer blieben stets niedriger als die gleichzeitig positiv werdenden IFAT-Titer und erreichten ein Maximum von 1:320.

Die B. equi-Titer fielen langsamer ab als die B. caballi-Konzentrationen; dies hatten HOLBROOK, FRERICHS und ALLEN (1972) schon beschrieben. Bei meinen Untersuchungen waren B. caballi-Titer bei unbehandelten Ponies schon 68 Tage p.i. nicht mehr nachweisbar. Eine Ausnahme bildete Pony 2, bei dem 11 Monate nach der Erstinfektion mit B. caballi noch ein Titer von 1:5 bestand. Nach der Behandlung mit Berenil^{R} konnten spätestens innerhalb von 32 bis 37 Tagen, bei Pony 2 bereits nach 10 Tagen in der KBR keine Antikörper gegen B. caballi mehr festgestellt werden. Dagegen bestanden im IFAT und ELISA zu diesem Zeitpunkt noch B. caballi-Titer von 1:128 bis 1:512; sie persistierten bis zum Versuchsende.

Die geringere Sensibilität der KBR im Vergleich zum IFAT wird auch durch die Ergebnisse bei Pony 1 bestätigt. Zu einem Zeitpunkt, als das Tier noch Parasitenträger war, konnten in der KBR keine Antikörper mehr nachgewiesen werden; dagegen bestand im IFAT noch ein Titer von 1:32. FRIEDHOFF (1982) berichtete ebenfalls über zwei experimentell mit B. equi infizierte Pferde, die 84 und schon 42 Tage nach der Infektion in der KBR negativ waren, obwohl sie noch Parasiten beherbergten. Auch FRERICHS, HOLBROOK und JOHNSON (1969b) konnten bei einem von 15 mit B. caballi infizierten Pferden noch Parasiten nachweisen, als die KBR bereits negativ war.

In Übereinstimmung mit GÖTZ (1982) traten in meinen Untersuchungen bei Verwendung von heterologem Antigen Kreuzreaktionen nicht auf. Im Gegensatz dazu beschrieben FRERICHS, HOLBROOK und JOHNSON (1969b) solche in der KBR während der Parasitämie. Bei mischinfizierten und heterolog superinfizierten Ponies konnte ich mit B. equi- und B. caballi-Antigen Antikörper nachweisen; dies berichteten auch HOLBROOK, FRERICHS und ALLEN (1972). Eine serologische Differenzierung von B. equi und B. caballi ist also mit der KBR ebenso möglich wie die Diagnose von Mischinfektionen.

Durch die geringe Sensibilität der KBR, worauf auch TODOROVIC (1975) hinweist, kann der Test negativ sein, obwohl noch Parasiten vorhanden sind. Damit ist eine Verschleppung der Babesiose nicht ausgeschlossen, wenn die KBR als alleinige Einfuhr-Kontrolluntersuchung angewendet wird; dies ist

beispielsweise in den USA seit dem ersten Auftreten der Pferdebabesiose 1961 der Fall. Durch diesen schnellen Abfall der komplementbindenden Antikörper, den BIDWELL (1978) auch bei der Rinderbabesiose beschreibt, konnten latente B. caballi-Infektionen nicht diagnostiziert werden. Immer waren in diesen Fällen IFAT und ELISA noch hoch positiv.

Die Titer im IFAT erreichten ausnahmslos höhere Werte (maximal 1:4096) als in der KBR und im ELISA. Bei Mischinfektionen mit B. equi und B. caballi reagierten wie in der KBR beide Antigene. Auch waren mit dem IFAT Antikörper auch dann noch nachzuweisen, wenn die KBR bereits negativ verlief. DONNELLY, JOYNER und FRANK (1980) gelang es, mit dem IFAT Antikörper gegen B. equi und B. caballi 12 Monate länger nachzuweisen als mit der KBR.

Bei mischinfizierten Ponies konnten im IFAT bis Versuchsende, unabhängig von einer Therapie, B. equi- und B. caballi-Antikörper nachgewiesen werden, während in der KBR nur noch B. equi-Titer persistierten, der IFAT scheint also sensitiver zu sein. Im Gegensatz zu den Ergebnissen von DONNELLY und Mitarb. (1980) traten bei meinen Untersuchungen Kreuzreaktionen (1:32) mit dem heterologen Antigen im IFAT auf. Bei mischinfizierten sowie heterolog superinfizierten Ponies traten B. equi- und B. caballi-Antikörper auf.

Eine Differenzierung von B. equi und B. caballi war mit dem IFAT möglich; mit dem homologen Antigen war die Antikörperkonzentration um bis 7 Stufen höher als mit dem heterologen. Allerdings ist während der latenten Infektion eine serologische Differenzierung schwierig, da mit beiden Antigenen niedrige Titer auftraten. Hier sollte die KBR hinzugezogen werden; in der KBR traten nur Reaktionen mit dem homologen Antigen auf.

Die im ELISA nach experimenteller Infektion nachweisbaren B. equi- und B. caballi-Antikörper persistierten bis Versuchsende. Die Titerhöhe war deutlich niedriger als im IFAT; es ließen sich lediglich Maximaltiter von 1:256 nachweisen. Auch traten Kreuzreaktionen bis zu 1:64 mit dem heterologen Antigen auf; darauf machten bereits GÖTZ (1982) und MERKLE (1983) aufmerksam.

Titer mit dem homologen Antigen lagen maximal 2 Titerstufen über der Reaktion mit dem heterologen. Eine artspezifische Diagnose läßt daher der ELISA nicht zu. Bei mischinfizierten Tieren reagierten ebenfalls beide Antigene. Auch bei monoinfizierten Pferden beobachtete ich Kreuzreaktionen.

Eine weitere Schwierigkeit lag in der Abgrenzung von positiven und negativen Seren, da auch nicht infizierte Tiere mit Titern von 1:16 bis 1:32 reagierten. Die Brauchbarkeit des ELISA beschränkt sich aufgrund meiner Ergebnisse auf screenings. Auch die Verwendung von säulenchromatographisch aufgetrenntem sowie durch Ammoniumsulfat- oder Protaminsulfatfällung gereinigtem Antigen erhöhte die Spezifität der Befunde im ELISA nicht.

Die Grenztiter der drei serologischen Nachweisverfahren waren unterschiedlich hoch. Während die KBR bereits bei einem Titer von 1:5 positiv war, wertete ich im IFAT B. equi-Titer von 1:32 und B. caballi von 1:64 sowie im ELISA eine Konzentration von 1:64 als positiv.

Aufgrund der vorliegenden Untersuchungsergebnisse ist eine sichere Diagnose der Babesiose des Pferdes nur dann möglich, wenn KBR und IFAT gleichzeitig zur Anwendung kommen. Die Kombination der hohen Sensibilität des IFAT und der größeren Spezifität der KBR sichern das Erkennen auch latenter Infektionen sowie eine artspezifische Unterscheidung.

Für die Oberprüfung der Berenil^{R}-Therapie erwies sich keine der 3 serologischen Methoden als geeignet. Auch die KBR lieferte keine eindeutigen Ergebnisse, obwohl sie als einzige serologische Methode mit einem Abfall der B. caballi-Titer um 2 bis 5 Stufen innerhalb von 36 Tagen nach Beginn der Therapie reagierte. Die Werte fielen innerhalb von 15 bis 28 Tagen nach Behandlungsbeginn auf 1:5 ab und persistierten dann 7 bis 15 Tage, bevor die KBR negativ wurde. Nur bei Pony 4 war 50 Tage nach der Therapie noch ein Titer von 1:5 nachweisbar. Da jedoch auch bei den nicht behandelten Ponies die KBR bereits nach 67 Tagen negativ war, konnte keine Therapiekontrolle durchgeführt werden.

Im Gegensatz dazu stehen die Ergebnisse von HOURRIGAN und KNOWLES (1979), wonach B. caballi-Antikörper in der KBR noch 6 Monate lang nach Therapie persistierten. Ein Abfall der B. equi-Titer war von vornherein nicht zu erwarten.

V. Zusammenfassung

An 11 experimentell mit Babesia equi und B. caballi mono- und mischinfizierten Ponies wurde der direkte Erregernachweis geführt, die Brauchbarkeit der KBR, des IFAT und des ELISA zur serologischen Differenzierung der beiden Babesienarten vergleichend überprüft.

Babesien ließen sich während der frischen Phase der Infektion zwischen dem 1. und 13. Tag p.i. direkt im gefärbten Blutausstrich nachweisen, in der latenten Phase war dies nur ausnahmsweise möglich. Der Antikörpernachweis gelang mit Hilfe der KBR und des IFAT erstmals zwischen dem 2. und 10. Tag p.i., mit dem ELISA zwischen dem 2. und 19. Tag p.i. In der KBR wurden Maximaltiter von 1:320 zwischen dem 13. und 37. Tag p.i., im IFAT von 1:4096 am 21. Tag p.i. und im ELISA bis 1:256 zwischen dem 10. und 33. Tag p.i. erreicht.

Im ELISA traten die stärksten Kreuzreaktionen auf, wobei die Titer mit dem homologen Antigen nicht deutlich von denen mit dem heterologen Antigen zu unterscheiden waren. Mit dem homologen Antigen wurden im IFAT in der frischen Phase der Infektion 5 bis 7 Stufen, in der latenten Phase 1 bis 2 Stufen höhere Titer erreicht als mit dem heterologen. Die KBR reagierte dagegen nur im homologen System; mit ihr gelang somit eine eindeutige artspezifische Diagnose.

Bei einem mit B. equi infizierten Pony reagierte die KBR nach 2 Jahren negativ, obwohl das Tier noch Parasitenträger war. Dagegen konnten im IFAT noch Titer von 1:32 nachgewiesen werden. Bei mit B. caballi infizierten, unbehandelten Ponies wurde die KBR bereits nach 67 Tagen negativ, im IFAT ließen sich weiterhin Antikörper nachweisen.

Da sowohl bei unbehandelten als auch bei behandelten Ponies die KBR spätestens nach 72 Tagen negativ war, ist sie für die Therapiekontrolle nicht geeignet.

Bedingt durch die Tatsache, daß die KBR bei Parasitenträgern negativ reagieren kann, wird zur sicheren Diagnose der equinen Piroplasmose der kombinierte Einsatz von IFAT und KBR als notwendig erachtet.

Aicher, B.M.: On possibilities to differentiate equine Babesia equi- and B. caballi infections by means of CFT, IFAT and ELISA

Summary

On 11 ponies, experimentally infected with Babesia equi and/or B. caballi, the course of parasitaemia and the possibility to serologically differentiate both Babesia species by means of CFT, IFAT and ELISA have been investigated.

Babesia could be demonstrated during the early stage of infection 1 to 13 days p.i. in the stained blood smear, after that only occasionally. Antibodies became demonstrable by means of CFT and IFAT 2 to 10 days, by means of ELISA between the 2. and 19. day post infection. Titremaxima of 1:320 occured 13 to 37 (CFT), 1:4096 at the 21. (IFAT), and up to 1:256 10 to 33 (ELISA) days p.i.

The strongest cross-reactivity showed the ELISA, titres obtained with the homologous antigen resembled those of the heterologous system. Fluorescent antibody-titres are 5 to 7 dilution-steps higher in the homologous system during the early stage of infection and 1 to 2 steps higher during the latent phase than in the heterologous system. The CFT reacted in the homologous system only, thus proved to be species-specific.

A two years previously B. equi-infected pony reacted serologically negativ by means of the CFT, but 1:32 in the IFAT, although the animal was still infected. Untreated B. caballi-infected ponies were serologically negative in the CFT already 67 days p.i., while the IFAT still showed high antibody-titres.

Complement-binding antibodies could not be demonstrated either in untreated nor treated ponies after the 72. day p.i. The CFT is, therefore, not suitable to confirm a successful treatment.

Due to the fact that still infected horses may react negative by means of CFT, serodiagnosis of equine piroplasmosis has to be carried out with both the complement-fixation (CFT) and the indirect fluorescent antibody test (IFAT).

VI. Literaturverzeichnis

Barnett, S.F. (1974): Babesia of horses in Britain.
Vet. Rec. 95, 346-347

Bidwell, D.E., P. Turp, L.P. Joyner, R.T. Payne, R.E. Purnell (1978): Comparison of serological tests of Babesia in British cattle.
Vet. Rec. 103, 446-449

Callow, L.L., W. McGregor, B.J. Rodwell, R.J. Rogers, G.C. Fraser, D.F. Mahoney, G.M. Robertson (1979): Evaluation of an indirect fluorescent antibody test to diagnose Babesia equi-infection in horses.
Austr. Vet. J. 55, 555-559

Donelly, J., L.P. Joyner, O. Graham-Jones, C.P. Ellis (1980): A comparison of complement fixation and immunofluorescent antibody tests in a survey of the prevalence of Babesia equi and Babesia caballi in horses in the Sultanate of Oman.
Trop. Anim. Hlth Prod. 12, 50-60

Donelly, J., L.P. Joyner, C. Frank (1980): Quantitative epidemiological studies on the prevalence of babesiosis in horses in Kuwait.
Trop. Anim. Hlth Prod. 12, 253-258

Engvall, E., P. Perlmann (1972): Enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA. III. Quantitation of specific antibodies by enzymelabelled antiimmunoglobulin in antigen-coated tubes.
J. Immunol. 109, 129-135

Frerichs, W.M., A.A. Holbrook, A.J. Johnson (1969a): Equine piroplasmosis: production of antigens for the complement fixation test.
Am. J. Vet. Res. 30, 1337-1341

Frerichs, W.M., A.A. Holbrook, A.J. Johnson (1969b): Equine piroplasmosis: complement fixation titers of horses infected with Babesia caballi.
A. J. Vet. Res. 30, 697-702

Friedhoff, K.T., A. Liebisch (1978): Piroplasmeninfektionen der Haustiere.
Tierärztl. Prax. 6, 125-139

Friedhoff, K.T. (1982): Die Piroplasmen der Equiden-Bedeutung für den internationalen Pferdeverkehr.
Berl. Münch. Tierärztl. Wschr. 95, 368-374

Geller, J., H.H. Heinert, H. Kühne (1981): Probleme bei der Bewertung des Enzyme-Linked-Immunosorbent-Assay verursacht durch Intergrundreaktionen (Background staining).
Berl. Münch. Tierärztl. Wschr. 94, 36-37

Götz, F. (1982): Untersuchungen über die Brauchbarkeit von ELISA, IFAT, IHA und KBR zum Nachweis von Babesia equi-Infektionen.
Vet. med. Diss., München

Heidrich-Joswig, S. (1982): Vergleichende Untersuchungen von Antikörpertitern sowie der Immunglobuline IgM und IgG während einer Babesia equi-Infektion.
Berl. Münch. Tierärztl. Wschr. 95, 439-442

Hirato, K., N. Ninomiya, Y. Uwano, T. Kutii (1945): Studies on the complement fixation reaction for equine piroplasmosis.
Jap. J. Vet. Sci. 7, 204-205

Holbrook, A.A., D.E. Cooperrider, T.O. Kirkham, W.H. Martin (1971): Protocol for the complement fixation test for equine piroplasmosis.
Proc. 75th Ann. Meet. U.S. Anim. Hlth Ass., 617-628

Holbrook, A.A., W.M. Frerichs, P.C. Allen (1972): Laboratory diagnosis of equine piroplasmosis.
Proc. 3rd Inter. Conf. Equine Infect. Dis., Paris III, 467-475

Hourrigan, J.L., R.C. Knowles (1979): Equine piroplasmosis.
Am. Ass. Equine Pract. Newsletter 1, 119-128

Knowles, R.C., J.L. Hourrigan, A.A. Holbrook (1980): Equine piroplasmosis.
Equine Practice 2, 10-14

Löhr, K.-F., J.P.J. Ross (1968): Ein Beitrag zur Verbesserung des indirekten Fluoreszenz-Antikörper-Testes bei der Diagnose intraerythrozytärer Parasitosen.
Z. Tropenmed. Parasitol. 19, 427-430

Lowry, D.H., N.J. Rosebrough, A.L. Farr, R.J. Randall (1951): Proteine-measurement with the folin phenol reagent.
J. Biol. Chem. 193, 265

Madden, P.A., A.A. Holbrook (1968): Equine piroplasmosis: indirect fluorescent antibody test for Babesia caballi.
Am. J. Vet. Res. 29, 117-123

Mahoney, D.F. (1972): Immune response to hemoprotozoa. II. Babesia spp.
In: Immunity to Animals Parasites, Academic Press Inc.

Mayr, A., P.A. Bachmann, B. Biebrack, G. Wittmann (1977): Virologische Arbeitsmethoden. II. Serologie.
Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, New York

Merkle, F.J. (1983): Untersuchungen über die Brauchbarkeit von KBR, IFAT und ELISA zum Nachweis der Babesia caballi-Infektion des Pferdes.
Vet. med. Diss., München

Moltmann, U.G., H. Mehlhorn, E. Schein, G. Rehbein, W.P. Voigt, E. Zweygarth (1983): Fine structure of Babesia equi Laveran, 1901 within lymphocytes and erythrocytes of horses: an in vivo and in vitro study. J. Parasitol. 69, 111-120

Rehbein, G., S. Heidrich-Joswig (1982): Use of schizont and piroplasm antigens of Babesia equi in the indirect fluorescent antibody test and complement fixation test. Vet. Parasitol 12, 135-145

Ristic, M. (1977): Equine babesiosis and trypanosomiasis: babesiosis. Proc. 1st Intern. S. Am. Ass. Equine Pract., 339-399

Roberts, E.D., J.H. Gainer, H.A. Mc Daniel (1962): Equine piroplasmosis. J. Am. Vet. Med. Ass. 11, 1323-1329

Ruitenberg, E.J., F. van Knapen (1977): The enzyme-linked immunosorbent assay and its application to parasitic infections. J. Infect. Dis. 136, 267-273

Schein, E., G. Rehbein, W.P. Voigt, E. Zweygarth (1981): Babesia equi (Laveran 1901). Entwicklung im Pferd und in den Lymphozytenkulturen. Trop. Parasit. 32, 223-227

Stepanova, N.J., V.V. Petrovskii (1975): Serological diagnosis of Nuttalia (Babesia) equi infection in horses (complement fixation test). Veterinariya Moscow 1, 56-58

Todorovic, R.A. (1975): Serological diagnosis of babesiosis: A review. Trop. Anim. Hlth Prod. 7, 1-14.

Herrn Prof. Dr. Dr. h.c. J. Boch danke ich sehr herzlich für die Oberlassung des Themas, seine verständnisvolle Hilfe und für die ausgezeichneten Arbeitsbedingungen am Institut.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Dr. G. Weiland, der mir bei der Durchführung dieser Arbeit stets durch wertvolle Hinweise und tatkräftige Unterstützung zur Seite stand.

Herrn Prof. Dr. E. Schein, Berlin, und Herrn Prof. Dr. K.T. Friedhoff, Hannover, danke ich für die freundliche Oberlassung von Infektionsmaterial.

Fräulein Astrid Schmerber danke ich für die freundliche Unterstützung in allen technischen Fragen.

Lebenslauf

Am 6. September 1958 wurde ich als Tochter des Chemotechnikers Albrecht Aicher und seiner Frau Marianne, geb. Sehr, in Ludwigshafen/Rhein geboren.

Nach dem Besuch der Volksschule in Frankenthal-Studernheim wechselte ich 1968 auf das Staatliche Karolinen-Gymnasium in Frankenthal/Pfalz, wo ich 1977 mein Abitur ablegte.

Im Wintersemester 1977/78 begann ich das Studium der Tiermedizin an der Ludwig-Maximilians-Universität München und schloß es im Februar 1983 mit dem 3. Staatsexamen ab. Seit dieser Zeit bin ich mit der Anfertigung meiner Dissertationsarbeit am Institut für Vergleichende Tropenmedizin und Parasitologie der Tierärztlichen Fakultät der Universität München beschäftigt.